

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公表

⑫ 公表特許公報(A)

平1-502158

⑬ 公表 平成1年(1989)8月3日

⑭ Int. Cl.⁴
C 12 P 21/02

識別記号

庁内整理番号
B-6712-4B審査請求 未請求
予備審査請求 未請求

部門(区分) 1(1)

(全 16 頁)

⑮ 発明の名称 ジベプチドの酸素的製造方法

⑯ 特 願 昭63-501981

⑰ 出 願 昭63(1988)2月15日

⑱ 翻訳文提出日 昭63(1988)10月12日

⑲ 国際出願 PCT/DK88/00022

⑳ 国際公開番号 WO88/06187

㉑ 国際公開日 昭63(1988)8月25日

優先権主張 ㉒ 1987年2月13日 ㉓ デンマーク(DK) ㉔ 0725/87

⑳ 発 明 者 ソルベック, ビア

デンマーク国 デイーケー-2970 ホールシヨルム, スドル, ヤグ
トベユ 39

㉑ 発 明 者 ウィツドマー, フレツド

デンマーク国 デイーケー-2980 コケツダル, ブロンシヨルムダ
ルズベユ 53㉒ 出 願 人 カールスパーグ バイオテクノ
ロジー リミテツド アクチー
セルスカブデンマーク国 デイーケー-2200 コベンハーゲン エヌ, タゲン
スベユ 16

㉓ 代 理 人 弁理士 浅 村 皓 外3名

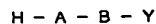
㉔ 指 定 国 AU, DK, FI, HU, JP, US

最終頁に続く

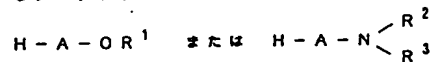
浄書(内容に変更なし)

請求の範囲

(1) 一般式

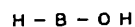


(式中、Aは側鎖が保護されていてもよいL-もしくはD-α-アミノ酸またはω-アミノ酸であり、Bは側鎖が保護されていてもよいAと同種もしくは異種のL-もしくはD-α-アミノカルボン酸、L-もしくはD-アミノホスホン酸またはL-もしくはD-アミノスルホン酸、または相当するω-アミノ酸、またはその塩および水和物であり、YはOHまたはC末端保護基である)を有するジベプチドを製造する方法において、式



(式中、Aは先に定義したとおりであり、R¹は水素、アルキル、アリールもしくはアラールキルであつて不活性置換基によつて置換されていてもよく、またアミノ酸のα-デス-アミノフラグメントであり、R²およびR³は同種または異種であつて、それぞれ水素、アルキル、アリールまたはアラールキルであつて不活性置換基で置換されていてもよい)を有するアミノ酸誘導体である基質成分を、A-Bの場合は in situで形成されてもよい、

例 式



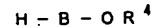
を有するL-アミノ酸、

例 式



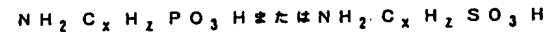
(式中、BはL-アミノ酸であり、R²およびR³は上述の意味を有するが、R²が水素の場合にはR³はヒドロキシまたはアミノであつてもよい)を有するL-アミノ酸アミド、

例 式



(式中、BはL-アミノ酸であり、R⁴はアルキル、アリールまたはアラールキルである)を有するL-アミノ酸エステル、および

例 式



(式中、xは1~6であり、zは2~12である)を有し、酸基が保護されていてもよい直鎖状または分枝状アミノホスホン酸またはアミノのスルホン酸

から選ばれる求核成分とを、酵母、動物、植物または他の微生物類からのセリンまたはチオールカルボキシペプチダーゼの存在下、pH5~10.5、所望により有機溶媒および/または塩を含有する水性溶媒または懸濁液中で反応させ、ついで所望により、存在する側鎖保護基もしくは保護基Yの切断および/または、所望により、得られたジベプチド誘導体の塩または水和物への置換を

行うことを特徴とする製造方法。

(2) カルボキシペプチダーゼとして、酵母からのカルボキシペプチダーゼYを使用する請求の範囲第1項による製造方法。

(3) 使用されるカルボキシペプチダーゼは、適合樹皮価格と複数個のカツプリングされたベンジルスクシニル基からなるアフィニティ樹脂上アフィニティクロマトグラフィーによつて精製されている請求の範囲第2項による製造方法。

(4) 使用されるカルボキシペプチダーゼは、Penicillium janthinellumからのペニシロカルボキシペプチダーゼS-1もしくはS-2、Aspergillus saitoiもしくはAspergillus oryzaeからのカルボキシペプチダーゼ、オレンジの葉もしくは皮からのカルボキシペプチダーゼC、Citrus natsudaoidai HayataからのカルボキシペプチダーゼC_H、豆の葉からのファセオリン、または芽芽大皮、モルト、ワタの胚芽、トマト、スイカもしくはフロメリン(パイナップル)皮からのカルボキシペプチダーゼである請求の範囲第1項による製造方法。

(5) 使用されるカルボキシペプチダーゼは、天然型の化学修飾された酵素または生合成産物である請求の範囲第1項から第4項までによる製造方法。

(6) 使用されるカルボキシペプチダーゼは、固定化されている前記請求の範囲のいずれかによる製造方法。

(7) 有機溶媒0~70%を含有する水性反応液に

たは反応分散液を使用する前記請求の範囲のいずれかによる製造方法。

(8) 有機溶媒はアルコール類、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド、ジメトキシエタン、エチレングリコールまたは酢酸エチルから選ばれる請求の範囲第7項による製造方法。

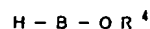
(9) 基質成分として、不活性置換基で置換されていてもよいベンジルエステルまたは直鎖状もしくは分岐状のC₁~C₆アルキルエステルから選ばれるD-またはL-アミノ酸エステルを使用する前記請求の範囲のいずれかによる製造方法。

(10) 求核成分として、式



(式中、R³は水素またはC₁~C₃アルキルであり、BはL-アミノ酸残基である)を有するアミノ酸またはアミノ酸アミドアミドを使用する前記請求の範囲のいずれかによる製造方法。

(11) 求核成分として、式



(式中、Bはアミノカルボン酸残基であり、R⁴はC₁~C₃アルキルである)を有するエステルを使用する請求の範囲第1項による製造方法。

(12) 得られたジペプチドが1個または2個以上のC末端保護基Yを包含し、この1個または2個以上の基を酵素的に、好ましくは前の反応で使用したと同じカルボ

淨書(内容に変更なし)

明 細 書

キシペプチダーゼ酵素により切断する前記請求の範囲のいずれかによる製造方法。

(13) 得られたジペプチドが1個または2個以上の側鎖保護基を包含し、この1個または2個以上の基を酵素的に、好ましくはエステラーゼもしくはリパーゼまたはタンパク分解酵素によつて切断する前記請求の範囲のいずれかによる製造方法。

ジペプチドの酵素的製造方法

本発明は、ジペプチドおよびジペプチド誘導体ならびに請求の範囲第1項の導入部分に述べた種類の化合物の酵素的製造方法に関する。

最近、D-コンフィギュレーションのアミノ酸残基を含有していてもよいジペプチドおよびジペプチド誘導体に対する興味、その薬理学的効果、たとえば抗生物質としての可能性から、高まりつつある。また、ヒトおよび家畜の人工栄養、甘味剤、さらには除草剤のような農薬の分野においても、ジペプチドに大きな興味ももたれてきた。

このようなジペプチドH-A-B-Yは、公知の化学的カツプリング反応によつて製造できるが、これらの方法はすべて、一般に関連アミノ酸、AおよびBのそれぞれアミノ基およびカルボン酸基を、またさらに側鎖が官能基を有するならば多くの場合、側鎖も保護する必要があるという特徴をもっている。しかも、使用する試薬および条件のため、化学的カツプリング工程の際に副反応が起こるという固有の危険がある。主な副反応はとくにA成分のラセミ化である。化学的カツプリング工程を、緩和な条件下に進行する酵素的カツプリング工程で置き換えることにより、このような副反応およびラセミ化が回避でき、立体化学的に純粋な生成物が得られる。

アミノおよびカルボキシル保護基の存在は、化学的カップリングでもエンドプロテアーゼを用いた酵素的カップリングでも同様に必須であり、また従来の知識でジペプチドの酵素的エキソプロテアーゼ触媒による形成でも基質のアミノ官能基には必要とされている。これは、上述の方法の工業的規模における経済性に著しく影響するいくつかの望ましくない特徴を付加し、とくにジペプチドの合成の場合とくに顕著である。

不利益はこれらの基の導入と除去に関連し、また操作工程でのこれらの基の存在は全過程の経費および所要時間を増大させ、回収率に影響する。

共通して用いられるアミノ保護基の代表例としては、カルボベンゾキシ(Z-)および三級ブトキシカルボニル(Boc-)型の基があり、これらの分子量はアミノ酸残基のそれにはほぼ匹敵する。まず、保護基は、別個の反応工程において、適切な高価な試薬により出発原料に導入し、ついで分離工程に付さねばならない。現在のところ、これらの疎水性の基はその中間体および反応生成物の溶解度に著しい影響を与える場合が多く、その処理に必要な溶媒の性質および量の両者、ならびに精製および脱保護の難易に影響する。脱保護にも別個の工程を行うことになり、ついで精製工程が必要になる。

この目的には、一連の反応を利用できるが、それ自体工業的には問題のある接触水素添加を除いて、これらの方法は数しい、多くの場合、強酸性または強塩基性条件

下に行われ、一連の副反応が起こることが多く、不純な生成物を生じ、面倒な精製が必要になる。

この比較的良いい連の合成工程の最終工程はかなり包括的な脱保護となり、所望のペプチドが得られるが、ほとんど回避できない二次反応により、所望の高純度の生成物を得るにはかなり面倒な精製操作を必要とすることが多い。

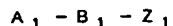
ジペプチドの製造におけるアミノ末端保護を回避する試みは、EP-A1-074095号およびEP-A2-102529号に記載されたアスパルテームの生成の場合の発酵工程のように微生物発酵の方向で検討されてきた。この方法は基本的に合成的アプローチとは異なり、それぞれのペプチドごとに特異的な生物に依存するもので、一般的に適用できるものではない。しかも、収率は低いことが多く、発酵培地からの回収も複雑である。

したがって、アミノおよびカルボキシル末端上の保護基を回避できることが、全過程の経済性という点で有利なことは自明である。本発明の目的は、これを、セリンおよびチオールカルボキシペプチダーゼ触媒によつて仲介されるジペプチド合成において可能にすることにある。ある場合には、側鎖保護基は有しても末端保護基はないジペプチドを製造できることは興味深く、本発明の方法によれば、側鎖は保護されているが、アミノないしカルボキシルは保護されていない出発原料に出発することが以下に示すように可能になる。この場合、同時に、逆相な反

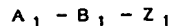
応条件と全過程の経済性という利点が達成される。所望により、側鎖保護基は化学的または酵素的手段で切断できる。

側鎖非保護アミノ酸残基と、C末端は保護されていなくてもよいB成分(求核性)の使用を可能にする酵素触媒カップリング反応は知られている[たとえばDK特許(出願第5202/80号および相当するEP特許出願第17485号(EP-B1-17485号)参照)。

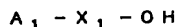
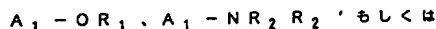
EP-B1-17485号には、一般式



(式中、 A_1 はN末端保護アミノ酸残基、またはC末端L-アミノ酸残基を有しN末端が保護されていてもペプチド残基であり、 B_1 はL-アミノ酸残基であり、 Z_1 はOHまたはC末端保護基である)で示されるペプチドを、基質成分とアミン成分との酵素の存在下に反応させ、ついで所望により任意の末端保護基を切断して、式

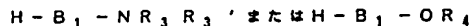


で示されるペプチドに導くことによつて製造する方法において、アミノ酸エステル、ペプチドエステル、デブシペプチドまたはNが置換されていてもよいアミノ酸アミド、またはN末端が保護されていてもよい式



(式中、 A_1 は先に定義したとおりであり、 R_1 はアルキル、アリール、ヘテロアリール、アラールキルまたは

アミノ酸残基の α -テスアミノフラグメントであり、 R_2 および R_2' はそれぞれ水素、アルキル、アリール、ヘテロアリールまたはアラールキルであり、 X_1 はL-アミノ酸残基である)で示されるペプチドから選ばれる基質成分を、式



(式中、 B_1 は先に定義したとおりであり、 R_3 および R_3' はそれぞれ水素、ヒドロキシ、アミノ、アルキル、アリール、ヘテロアリールまたはアラールキルであり、 R_4 は水素、アルキル、アリール、ヘテロアリールまたはアラールキルである)で示されるNが置換されていてもよいL-アミノ酸アミド、L-アミノ酸またはL-アミノ酸エステルと、酵母もしくは動物、植物または他の微生物起源の酵素、L-特異性セリンまたはチオールカルボキシペプチダーゼの存在下、pH5~10.5の水溶性溶液または分散液中、好ましくは20~50℃で反応させることを特徴とする方法が記載されている。好ましい酵素は酵母からのカルボキシペプチダーゼYであり、以下CPD-Yと呼ぶ(この記号の意味の混乱を避けるために付するが、上述の記号の意味はEP-B-17485号に用いられた意味と同じではない)。

したがって、ジペプチドをEP-B-17485号の方法によつて製造する場合、基質成分は必ずN末端保護アミノ酸残基でなければならぬし、構成アミノ酸は必ずL-アミノ酸でなければならない。

特表平1-502158 (4)

さらに一般的には、基質成分におけるN末端アミノ基保護の必要性は、ペプチド残基の鎖長が長くなるに従い低下し、3個のアミノ酸からなるペプチド残基では、その種類および配列によつては保護の必要がなくなるといわれている。

これは、Breddeらにより、"Influence of the substrate structure on carboxypeptidase Y catalyzed peptide bond formation", Carlsberg Res. Commun., 第45巻、361~367頁(1980年12月30日)に例示されていて、Ac-A α -A α -A α -A α -OMeおよびH-A α -A α -A α -A α -OMeがH-LeuNH₂とCPD-Yの存在下にカップリングされ、それぞれAc-A α -A α -A α -A α -LeuNH₂およびH-A α -A α -A α -A α -LeuNH₂が90%および80%の収率で得られている。

Breddeらは、CPD-Y触媒ペプチド合成におけるカップリングの収率に対するアミノ酸のコンフィギュレーションの重要性も検討し、次表のような結果を得ている。表中、A α はL-アラニン、a α はD-アラニンを示している。

基 質	生 成 物	収 率 (%)
H-A α -A α -A α -OMe	H-A α -A α -A α -LeuNH ₂	80
H-A α -a α -A α -OMe	H-A α -a α -A α -LeuNH ₂	40
H-A α -A α -a α -OMe	H-A α -A α -a α -LeuNH ₂	0

条件：基質25mM、0.1MKCl、1mMEDTA、pH9.5、CPD-Y12 μ m、0.2MLeuNH₂、反応は20分後に停止させた。

表から明らかのように、C末端がH-A α -A α -a α -OMeのようにD型であるとエステルが反応しないため、ペプチド合成が起らない。H-A α -a α -A α -OMeのようにD-アミノ酸がC末端の隣にあると、反応は起こるがカップリングの収率は純粋なL-コンフィギュレーションのH-A α -A α -A α -OMeの場合の80%に対し40%に低下する。

さらに、一部のエンドプロテアーゼは、L-コンフィギュレーションを有するある種のN-非保護アミノ酸エステルオリゴメリゼーションを触媒できることは以前から知られていたが、単純なダイマーではないペプチドの製造にこれを用いることは、従来試みられたことがない。一般に、このような観察の結果は、一連のオリゴマーの混合物であつて、時には長く、そして単一の生成

物を単離できたとしても生成物沈殿の場合のみであつた。

この理由から、ペプチド合成におけるエンドプロテアーゼの使用は、米国特許第4,086,136号に例示されているように、アミノおよびカルボキシ末端保護出発原料を用いる場合に限られていた。

また、米国特許第3,972,773号に例示されたようにアスパルテートエンドプロテアーゼを使用する場合、またEP-A1-009585号において

Z-Asp-Phe-OMe-Phe-OMe塩の合成に例示されたようにメタロエンドプロテアーゼを使用する場合も、これらの種類の出発原料が必須である。

最後に、D、L；L、DおよびD、D-コンフィギュレーションのジアステレオマーペプチドならびにアミノ非保護出発化合物からの β -アミノ酸残基を含むペプチドの合成は、これまでカルボキシペプチダーゼによつては不可能であつたし、一般にどんなタンパク分解酵素(分類EC3,4)でも可能ではなかつた。別の分類の酵素、たとえばEP-A1-086053号に例示されているようなアミノアシル-t-RNA-シントナーゼ(分類EC6,1)である努力が行われたことはある。この場合には、アミノ酸残基の各タイプ毎に特定の酵素を使用しなければならないし、さらにATPのような高価な補因子が必要である。しかも、収率は低く、ある種の生成物が単離され同定されたとしても、通常10倍もの過剰の補因子、100倍過剰の求核試薬、反応で10

00倍まで過剰の酵素が必要であつた。

本発明は、驚くべきことに、EP-B1-17485号に用いられたセリンおよびチオールカルボキシペプチダーゼが、ペプチドおよびペプチド誘導体の合成のための制御反応における基質成分としてN-非保護アミノ酸エステルを使用できること、そして基質のオリゴメーションの可能性を抑えることが可能なことを見出したものである。

さらに驚くべきことに、これらの反応では、D-コンフィギュレーションのN-非保護アミノ酸誘導体を基質として使用することも可能で、L、L-ペプチドのほかD、L-ペプチドも合成できることが明らかにされた。D基質の反応速度は均一な条件ではL-基質の反応速度に比べてやや低いが、以下に例示するように、相当するN-保護アミノ酸エステルの場合のD-基質がL-基質の反応速度よりはるかに低速度でしか反応しないのに比べて、反応速度の差ははるかに小さい。収率は以下の例に示すように、非保護L-基質の場合に比べて非保護D-基質はほぼ同じか、わずかに高い。

さらにもつと驚くべきことに、この製造の基質とは、D-コンフィギュレーションの求核試薬は、他の場合には合成点のアミノ酸でL-特異的であることが知られていたこれらの酵素によつてカップリングできることが明らかにされた。この方法で導入されるアミノ酸エステルは加水分解されない。

特表平1-502158(5)

したがって、本発明の方法は、請求の範囲第1項の特
徴部の定義によつて特徴づけることができるものである。

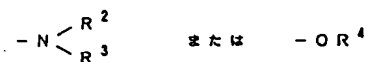
有用なアミノ酸の例には、モノアミノモノカルボン酸
たとえばグリシン(Gly)、アラニン(Ala)、バ
リン(Val)、ノルバリン(Nval)、ロイシン
(Leu)、イソロイシン(Iso-Leu)およびノ
ルロイシン(Nleu)、ヒドロキシアミノ酸たとえば
セリン(Ser)、スレオニン(Thr)およびホモセ
リン(homo-Ser)、含硫アミノ酸たとえばメチ
オニン(Met)またはシスチン(CysS)およびシ
ステイン(CysH)、モノアミノジカルボン酸とえ
ばアスパラギン酸(Asp)、グルタミン酸(Glu)
およびそれらのアミドたとえばアスパラギン(Asn)
およびグルタミン(Gln)、ジアミノモノカルボン酸
たとえばオルニチン(Orn)およびリジン(Lys)、
アルギニン(Arg)のような脂肪族アミノ酸、フェニ
ルアラニン(Phe)およびチロシン(Tyr)のよう
な芳香族アミノ酸、ならびにヒスチジン(His)、プ
ロリン(Pro)およびトリプトファン(Trp)のよう
な異項酸アミノ酸がある。もつと例外的な有用なアミ
ノ酸の例としては、ペニシラミン(Pen)、アミノホ
スホン酸たとえばアラニンホスホン酸(AlaP)、ア
ミノスルホン酸たとえばタウリン(Tau)、ω-アミ
ノ酸たとえばβ-アラニン(βAla)を挙げることが
できる。上述のように、これらは基質成分中にD型で包

含されてもよいし、求核試験成分中にD型で存在しても
よい。

上述の公知の方法に対する本発明の方法の利点は、側
鎖保護を最小または不要とし、基質成分はD-および
L-コンフィギュレーションのいずれでもよく、保護は
必要なく、ラセミ化の危険がなく、合成工程は少なく、
比較的純粋な最終生成物が期待でき、これらの結合によ
り著しく単純で、経済的な製造方法を与えることである。

好ましい基質成分は、R¹が1個から6個までの炭素
原子を有する直鎖状もしくは分枝状アルキルたとえばメ
チル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソ
ブチル、tert-ブチル、アミルおよびヘキシル、または
アラールキルたとえばベンジルであるエステルである。
とくに適当な求核性成分は、R²がHでR³がHもしくは
C₁~C₆アルキルである遊離L-アミノ酸もしくは
アミノ酸アミド、またはR⁴が1個から6個までの炭素
原子を有する直鎖状もしくは分枝状アルキルたとえば
上述の基のアミノ酸エステルである。上述のように、アル
キル、アリールまたはアラールキルであつて、不活性
置換基たとえばヒドロキシまたはニトロで任意に置換さ
れていてもよい。

本発明はまた、基



が含有するペプチドを中間的に形成し、ついでこの基を

除去してカルボキシル酸塩を形成することを包含する方
法である。この除去はペプチドの形成に使用したのと同
なるまたは同じ酵素を触媒とすることができる。

酵素はまた、側鎖保護基の切断にも使用できる。適用
できる酵素は、その保護基の性質に応じて、タンパク分
解酵素、リパーゼおよびエステラーゼである("The
Peptides, Analysis, Synthesis, Biology", Vol. 9,
Special Methods in peptide Synthesis Part C. J. A.
Glaas, Enzymatic manipulation of Protecting Groups
in Peptide Synthesis, Academic Press 1987、参
照)。

本発明の方法は、CPD-Yを用いて実施することが
できる。これは現在のところ好ましい酵素であり、
EP-B1-17485月に詳細に特徴が述べられてい
る。また、他のセリンまたはチオールカルボキシペプ
チダーゼ、たとえば以下の一覧表に示す酵素も、これらは
アシル酵素中間体を介して共通の活性機構を有するので、
本発明の方法に使用できる。

酵 素	起 原
	菌
ペニシロカルボキシペプチダーゼ	Penicillium
S-1	Janthinellum
-S2	-
カルボキシペプチダーゼ	Aspergillus
-	saltol
	Aspergillus
	oryzae
	植 物
カルボキシペプチダーゼC	オレンジの皮
	オレンジの皮
カルボキシペプチダーゼCN	Citrus natsudaikai
	Hayata
ファセオリン	豆の胚
カルボキシペプチダーゼ	発芽大豆またはモルト
	ワタの胚芽
	トマト
	スイカ
	プロメリン(パイナツ
	プル) 末

上述のカルボキシペプチダーゼ間の近縁関係については Kubota: Carboxypeptidase C. J. Biochem., 74: 757~770 (1973) に記載されている。モルト、小変および他の原料からのカルボキシペプチダーゼについては Breddan: Carlsberg Res. Comm., 51: 83~128 (1986) に述べられている。

使用されるカルボキシペプチダーゼは化学的に修飾されたもの、または天然型の生合成産物であってもよい。

以下にさらに詳細に例示するように、本発明の方法はかなり単純ではあるが、反応混合物のpH値はかなり一定に保持することが重要である。このpH値は5~10.5であるが、好ましくは7~9.5で、また具体的な出発原料、生成するペプチドおよび酵素によつて変動する。

反応は水性反応メジウム中で実施されるが、所望により、水に混和性または非混和性で、特定の条件下に酵素と適合性のある有機溶媒70%までを含有させることができる。好ましい溶媒は低級アルコール、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、ジメトキシエタン、エチレングリコールおよび酢酸エチルである。

反応温度は室温およびそれ以上、20~50℃が好ましいが、他の条件下の方が有利な場合は0~60℃の範囲の温度も使用できる。

2つの反応成分の濃度は、広い範囲内で変化させることができるが、多くの場合、求核試薬成分は過剰とし、基質成分はそのオリゴメリゼーションを避けるために全

反応期間中に間隔をおいて少量ずつ加えることが多い。使用するエステルがエチルまたはより高級な場合には置くべきことにオリゴメリゼーションは起こらず、副反応を伴わないで高い基質濃度を使用することができる。A-Bのホモジペプチドを単一の出発化合物から、オリゴメリゼーションを起こすことなく生成させるには、このエステルの加水分解により求核性成分を *in situ* で生成させる。これは場合により、さらに技術的な利点がある(第2図参照)。

基質成分の最初の濃度は通常0.005~2モルであり、求核性成分は別個に添加する場合0.005~3モルである。多くの場合、過剰の求核性成分、および基質成分からの加水分解生成物は回収でき、必要に応じて再エステル化して再使用できる。両成分の濃度は、その構造が簡単で、副反応および脱保護による損失がないのでとくに容易である。

酵素濃度も同様に広く変動させることができるが、多くの場合、N保護アミノ酸エステル基質を使用するときの適当な濃度よりいくらか高く(5~50μm)する。しかしながら、以下の実施例に例示するように、合成の目的に必要な量は安定な固定化酵素プレレーションを使用することにより10分の1以下に低減でき、またこれにより酵素を連続過程で使うことが可能になる。

反応メジウムには、酵素の基質への結合に影響する塩、たとえば食塩、ならびに酵素を安定化するために存在す

る金属イオンの複合結合剤たとえばEDTAを含有させることもできる。

最初に述べたD-およびL-基質間での反応速度の差は第1図に例示する。第1図は保護および非保護アミノ酸エステル(Tyr-OEt) D-およびL-型のCPD-Y加水分解に対する反応順序を示している。

図から明らかなように、L-AcTyrOEtはほとんど即時に加水分解されるが、D-AcTyrOEtでは2時間後にも有意でない加水分解(5%未満)が起こっているにすぎない。

これに対して、非保護エステルのL-およびD-型の差はわずかである。

この置くべき加水分解順序は、酵素CPD-YおよびモルトカルボキシペプチダーゼII(CPD-MII)、小変カルボキシペプチダーゼ(CPA-W)を用いて本発明の方法による各種ジペプチドの製造を例示した以下の実施例に明らかである。

例1~15の一般的方法

反応容量1mlの分析規模で実施した反応はpHスタット中で行い、選択したpH値は1N NaOHの自動添加によつて一定に保持した。反応温度はとくに指示のない限り室温とした。強には、反応濃度、有機溶媒含量、生成物および収率も変わる。反応時間は通常0.5~5時間、酵素濃度はとくに指示のない限り通常10~20μmである。

生成物の同定および生成物の収率の決定は、

C₁₈NOVA PAKカラム(Waters, RCM)上、50mMトリエチルアンモニウムホスフェート、pH3.0、0~80%アセトニトリルを含有する適当な勾配溶出系を流速2ml/分で用いる逆相HPLC(Waters 6000Aポンプ、660勾配ブレンダー、UK6インジェクター)により実施した。溶出はUV検出器(Waters 480)により、230nm、254nm、278nmまたは290nmで実施した。

生成物は、推定される生成物ピークに相当するHPLC分析分画のアミノ酸分析および/または化学的に合成した標品生成物とのHPLC比較によつて同定した。標品生成物は公知の原理に従い、通常、BOC-A-OSuすなわち基質アミノ酸のtert-ブチルオキシカルボニル-コハク酸イミドエステル誘導体と使用される求核性成分との間の反応、ついでN末端アミノ酸残基の脱保護により製造した。いずれの場合も、ジエステロマーD-L-およびL-D-ジペプチド生成物からL-L-およびD-D-ジペプチドを分離することができた。

230nmでしか検出できない生成物については、生成物の収率は、化学的に合成した標品化合物の吸収/濃度曲線によつて決定した。他の生成物については、生成物または反応原料が吸収を示す波長に相当する溶出クロマトグラムのピーク下の積分面積の比に基づいて決定した。

製造例16~21の反応条件は各例に記載する。反応

は上述のように分析HPLCで追跡した。相当する分析例に比べて酵素活性は一般に低く、反応時間は短い。反応条件を至適化する試みはなされていない。

例1

基質成分としてL-チロシンエチルエステル(50 mM)、求核試薬として遊離アミノ酸によるL-リジペプチドのカルボキシペプチダーゼY^{a)}触媒合成

求核試薬	(濃度)	溶媒	pH	生成物	収率%
アラニン	(1.9M)	水	9.5	TyrAlaOH	10
アルギニン	(0.8M)	水	9.5	TyrArgOH	31
システイン	(1M)	水	8.0	TyrCysOH	30
DL-システイン	(2M)	水	8.0	TyrCysOH(LL)	40
ロイシン	(0.2M)	水	8.0	TyrLeuOH	1
リジン	(2M)	水	9.5	TyrLysOH	18
メチオニン	(0.3M)	水	8.0	TyrMetOH	8
メチオニン	(0.3M)	水	9.0	TyrMetOH	9
メチオニン	(0.3M)	30% DMSO	9.0	TyrMetOH	15
メチオニン	(0.3M)	15% EtOH	9.0	TyrMetOH	7
グルタミン	(0.8M)	水	9.5	TyrGlnOH	8
ベニシラミン	(0.5M)	水	8.0	TyrPenOH	7

a) 10 μM、1 mM EDTA

基質	求核試薬	(濃度)	溶媒	pH	生成物	収率%
TyrOEt	ロイシンアミド	(0.2M)	30% DMSO	9.5	TyrLeuNH ₂ ^{b)}	42
					TyrLeuOH	4
TyrOEt	リジンアミド	(0.3M)	水	9.5	TyrLysNH ₂	20
					TyrLysOH	22
TyrOEt	アルギニンアミド	(0.2M)	水	9.0	TyrArgNH ₂	50
TyrOEt	バリンアミド	(0.3M)	水	9.0	TyrValNH ₂	77
TyrOEt	ロイシンメチルエステル	(0.2M)	30% DMSO	9.0	TyrLeuOH	6

a) 20 μM、1 mM EDTA

b) 反応時間>20時間、50%の基質が変換

例2

求核性成分としてのL-メチオニン(0.3M)によるpH9.0の水中でのL-リジペプチドのカルボキシペプチダーゼY^{a)}触媒合成

基質(50mM)	生成物	収率%
ロイシンメチルエステル	LeuMetOH	30
ロイシンイソプロピルエステル	LeuMetOH	36
メチオニンエチルエステル ^{b)}	MetMetOH	25
フェニルアラニンメチルエステル	PheMetOH	16
フェニルアラニンエチルエステル	PheMetOH	19
フェニルアラニンイソプロピルエステル	PheMetOH	23
セリンイソプロピルエステル ^{c)}	SerMetOH	21
トリプトファンメチルエステル	TrpMetOH	26
チロシンベンジルエステル ^{d)}	TyrMetOH	19

a) 10 μM、1 mM EDTA、b) 5mM、

c) 反応時間>20時間、d) 30% DMSO

例3

基質成分としてL-チロシンエチルエステル(50 mM)、求核試薬としてL-アミノ酸アミドまたはエステルを用いるL-リジペプチドのカルボキシペプチダーゼY^{a)}触媒合成

例4

単一の出発化合物から、pH8.5の水中でのLL-ホモペプチドのカルボキシペプチダーゼY^{a)}触媒合成

基質	(濃度)	生成物	収率%
メチオニンメチルエステル	(0.5M) ^{b)c)}	MetMetOH	14
メチオニンエチルエステル	(0.5M)	MetMetOH	16
メチオニンイソプロピルエステル	(0.5M)	MetMetOH	14
チロシンメチルエステル	(0.2M)	TyrTyrOH	1
チロシンエチルエステル	(0.2M)	TyrTyrOH	1
フェニルアラニンエチルエステル	(0.2M) ^{b)e)}	PhePheOH	2
アラニンアミド	(0.2M) ^{f)d)}	AlaAlaNH ₂	b)

a) 10 μM CPD-Y、1 mM EDTA、

b) 重合、c) 沈殿、d) pH9.0、e) 30% DMSO、

f) 50 μM CPD-Y、1 mM EDTA

例5

基質としてD-チロシンエチルエステル(50 mM)および求核試薬として遊離L-アミノ酸を用い、水中での、D-リジペプチドのカルボキシペプチダーゼY^{a)}触媒合成

特表平1-502158(8)

求核試薬	(濃度)	pH	生成物	収率%
アルギニン	(1M)	9.0	tyrArgOH	75
システイン	(1M)	8.0	tyrCysOH	86
LD-システイン	(2M)	8.0	tyrCysOH (DL)	45
ロイシン	(0.2M)	8.0	tyrLeuOH	22
メチオニン	(1M)	9.0	tyrMetOH	65
ベニシラミン	(1M) ^{b)}	8.0	tyrPenOH	27

a) 10μM、1M EDTA

b) 反応時間>20時間

例 6

求核性成分として L-メチオニン (0.3M) を用い、
pH 9.0、水中での D、L-ジベアチドのカルボキシペ
プチダーゼ Y^{a)} 触媒合成

D-基質 (50mM)	生成物	収率%
ロイシンメチルエステル	LeuMetOH	50
ロイシンイソプロピルエステル	LeuMetOH	71
メチオニンエチルエステル	metMetOH	68
フェニルアラニンエチルエステル	pheMetOH	71
フェニルアラニンイソプロピルエステル	pheMetOH	72
セリンイソプロピルエステル	serMetOH ^{b)}	46
トリプトファンエチルエステル	trpMetOH	72

a) 15μM、1M EDTA、b) 反応時間-5日

例 7

基質成分として D-チロシンまたは D-フェニルアラ
ニンエチルエステル、求核性成分として L-アミノ酸ア
ミドを用い、水中での D、L-ジベアチドアミドのカル
ボキシペプチダーゼ Y^{a)} 触媒合成

基質	求核試薬	(濃度)	pH	生成物	収率%
tyrOEt	ロイシンアミド	(0.2M)	9.0	tyrLeuNH ₂	82
				tyrLeuOH	2
tyrOEt	バリンアミド	(0.3M)	9.0	tyrValNH ₂	94
tyrOEt	アルギニンアミド	(0.2M)	9.0	tyrArgNH ₂	86
PheOEt	アラニンアミド	(0.8M)	9.0	PheAlaNH ₂ ^{b)}	50

a) 15μM、1M EDTA

b) 一部重合が認められる

例 9

基質成分として L-TyrOEt (50mM)、求核試
薬として側鎖保護 L-アミノ酸およびアミドを用いた側
鎖保護カルボキシ末端アミノ酸の L、L-ジベアチドの
カルボキシペプチダーゼ Y^{a)} 触媒合成

例 8

D-基質エステル成分を求核性成分としても作用させ、
pH 9.0、水中での D、D-ホモベアチドエステルのカル
ボキシペプチダーゼ Y^{a)} 触媒合成

D-基質	(濃度)	生成物	収率%
チロシンエチルエステル	(0.05M)	tyrtyrOEt	9
フェニルアラニンエチルエステル	(0.1M)	phepheOEt	10
チロシンエチレンジグリコールエステル	(0.05M)	tyrtyrOEtOH	1
メチオニンメチルエステル	(0.1M)	metmetOH	3

a) 15μM、1M EDTA

特表平1-502158(9)

求核性試薬	(濃度)	pH	溶媒	生成物	収率%
アセタミドメチル システイン	(1M)	8.5	水	TyrCys(-SAcM)OH	10
アセタミドメチル システインアミド	(0.4M)	8.5	水	TyrCys(-SAcM)NH ₂	12
				TyrCys(-SAcM)OH	1
β-ベンジル アスパラギン酸	(0.1M) ^{b)}	9.0	30% DMSO	TyrAsp(OBzl)OH	13
ε-トリフルオロ アセチルリジン	(0.1M) ^{b)}	8.5	30% DMSO	TyrLys(Tfa)OH	12
γ-tert-ブチル グルタミンアミド	(0.1M) ^{b)}	8.0	30% DMSO	TyrGlu(OtBu)NH ₂	3
				TyrGlu(OtBu)OH	12
γ-メチル グルタミン酸	(0.3M)	8.5	水	TyrGlu(OMe)OH	20
γ-エチル グルタミン酸	(0.3M)	8.5	水	TyrGlu(OEt)OH	18

a) 10μM、1M EDTA

b) 25%溶媒、20μM

求核性試薬	(濃度)	pH	溶媒	生成物	収率%
アセタミドメチル システイン	(1M)	8.5	水	tyrCys(-SAcM)OH	75
アセタミドメチル システインアミド	(0.4M)	8.5	水	tyrCys(-SAcM)NH ₂	71
				tyrCys(-SAcM)OH	6
β-ベンジル アスパラギン酸	(0.1M) ^{b)}	9.0	30% DMSO	tyrAsp(OBzl)OH	54
ε-トリフルオロ アセチルリジン	(0.1M) ^{b)}	8.5	30% DMSO	tyrLys(Tfa)OH	51
γ-tert-ブチル グルタミンアミド	(0.1M) ^{b)}	8.0	30% DMSO	tyrGlu(OtBu)NH ₂	42
				tyrGlu(OtBu)OH	10
γ-メチル グルタミン酸	(0.3M)	8.5	水	tyrGlu(OMe)OH	75
γ-エチル グルタミン酸	(0.3M)	8.5	水	tyrGlu(OEt)OH	71

a) 10μM、1M EDTA

b) 25%溶媒、20μM

例 10

基質成分としてD-TyrOEt(50mM)、求核試薬として側鎖保護L-アミノ酸およびアミドを用いた側鎖保護カルボキシ末端アミノ酸のカルボキシペプチダーゼY^{a)}触媒合成

例 11

側鎖保護基質成分(25mM)からの側鎖保護アミノ末端アミノ酸残基と求核成分としてL-メチオン(0.3M)、pH9.0、30%DMSO中でのL-ジペプチドのカルボキシペプチダーゼY^{a)}触媒合成

基質	生成物	収率%
L-アスパラギン酸ジベンジルエステル ^{b)}	Asp(OBzl)MeOH	65
L-グルタミン酸ジベンジルエステル	Glu(OBzl)MeOH	70

a) 20μM、1M EDTA、反応時間>20時間

b) 35%収率において

c) 60%収率において

例 12

L-およびD-アミノ酸エステル基質を水中50mMならびに求核試薬としてβ-アラニンおよびβ-アラニンアミドからのω-アミノ酸含有ジペプチドエステルおよびアミドのカルボキシペプチダーゼY^{a)}触媒合成

基 質	求 核 試 薬	(濃度)	pH	生 成 物	収率%
tyrOEt	β -アラニンメチルエステル	(0.2M)	8.5	tyrBAlaOMe	51
tyrOEt	β -アラニンメチルエステル	(0.5M)	8.5	tyrBAlaOMe	72
pheOEt	β -アラニンメチルエステル	(0.5M)	9.0	pheBAlaOMe	83
PheOEt	β -アラニンメチルエステル	(0.5M)	9.0	PheBAlaOMe	15
pheOEt	β -アラニンアミド	(0.5M)	9.0	pheBAlaNH ₂	70
PheOEt	β -アラニンアミド	(0.5M)	9.0	PheBAlaNH ₂	3

a) 20 μ M, 1 μ M EDTA

例 1 3

基質成分としてL-およびD-チロシンならびにL-フェニルアラニンのヒドロキシアルキルエステル(50 μ M)と、求核試薬として遊離L-メチオニン(0.3M)、pH9.0、水/エチレングリコール中からのL-、L-およびD-、L-ジペプチドのカルボキシペプチダーゼY^{a)}の触媒合成

基 質	%グリコール(v/v)	生 成 物	収率%
TyrOEtOH	0	TyrMetOH	10
TyrOEtOH	40	TyrMetOH	8
TyrOEtOH	60 ^{b)}	TyrMetOH	5
tyrOEtOH	0	tyrMetOH	56
PheOEtOH	0	PheMetOH	16

a) 5 μ M, 1 μ M EDTAb) 10 μ M, 1 μ M EDTA

例 1 4

pH8.0における水中L-基質エステル濃度50 μ Mと求核成分としてL-アミノ酸およびアミドから、大麦および小麦のカルボキシペプチダーゼによるL-、L-ジペプチドの触媒合成

酵 素	基 質	求核試薬	(濃度)	生 成 物	収率%
CPD-MII ^{a)}	PheOEt	メチオニン	(0.4M)	PheMetOH	10
CPD-W ^{b)}	PheOEt	アルギニン	(0.8M)	PheArgOH	8

a) 20 μ M, 1 μ M EDTA, 2M NaClb) 10 μ M, 1 μ M EDTA

例 1 5

pH8.0における水中D-フェニルアラニン初期濃度50 μ Mと、求核成分としての遊離L-アミノ酸から、大麦および小麦のカルボキシペプチダーゼ触媒によるD-、L-ジペプチドの合成

酵 素	基 質	求核試薬	(濃度)	生 成 物	収率%
CPD-MII ^{a)}	pheOEt	メチオニン	(0.4M)	pheMetOH	15
CPD-W ^{b)}	pheOEt	アルギニン	(0.8M)	pheArgOH	13
CPD-W ^{b)}	pheOEt	メチオニン	(0.4M)	pheMetOH	40

a) 20 μ M, 1 μ M EDTA, 2M NaClb) 10 μ M, 1 μ M EDTA, 2M NaCl, 反応時間>20時間、
収率 50%未満

例 1 6

L-チロシルシステインTyrCysOHの製造的合成

操 作

L-チロシンエチルエステル塩酸塩(1.5g、6ミリモル)とL-システイン(15.2g、125ミリモル)を1 μ M EDTA含有0.1M KCl溶液110 μ lに溶解した。pHをトリエチルアミンで8.0に調整した。カルボキシペプチダーゼY溶液(16 μ l/1 μ M)7.5 μ lを加えて反応を開始させ、反応期間中、室温で攪拌を続けながらトリエチルアミンを添加してpHを8.0に保持した。基質の残部(13.5g、54ミリモル)は1.5gずつ1時間で添加した。0.5時間後にチロシンの沈殿が始まり、3.5時間後に45 $^{\circ}$ Cに20分間加熱して反応を停止した。

生成したチロシンを除去し、溶液を60 μ M C₁₈-粒子を充填したカラム(5.7 \times 30 μ m)2本と層出液として50 μ M酢酸を用いてR-製造HPLC(Waters Prep. LC/System 500A)により精製した。純粋な生成物を含む分画を集め、繰り返し無水エタノールを添加して真空中で乾燥乾燥した。残留物をジエチルエーテルと攪拌した。残って、3.88gのL-チロシルシステイン(14ミリモル、22%)が遊離および乾燥によつて単離された。

図 定

塩化物および酢酸塩は検出されず、生成物は両性イオンとして存在した。

酸加水分解およびCysのアクリロニトリルによる誘導体化後のアミノ酸分析の結果は次のとおりであった。

Tyr (1.00)

Cys (1.08)

純度

システイン側鎖のアクリロニトリルによる誘導体化後、シリカゲル60-F上、ニンヒドリン検出を用いたTLCで唯一のスポットのみが検出された(Rf 0.73、溶出液：酢酸エチル、ブタノール、酢酸および水(1:1:1:1))。

HPLC-純度：99.5% (ヌクレオシド 7 C₁₈、0.1Mアンモニウムホスフェート、pH3.0/アセトニトリル、220nm)

UV定数：98.5% (293nm、0.1M NaOH中チロシン吸収)

例17

L,L-メチオニン-メチオニンMe t Me t OHの製造的合成

操作

L-メチオニンエチルエステル塩酸塩(24.6g、115ミリモル)とL-メチオニン(20.6g、138ミリモル)を、1M EDTA含有0.1M KCl溶液190mlに溶解した。pHを水酸化ナトリウム溶液で

9.0に調整し、カルボキシペプチダーゼY溶液(20mg/ml)14.2mlを加えて反応を開始させた。反応液を室温で一晩攪拌し、この間pH-スタットにより水酸化ナトリウム溶液を添加してpHを9.0に保持した。反応終了時に、HCl-溶液でpHを3.0に調整した。

沈殿したメチオニンを濾去し、濾液を例16に記載したようにしてR-製造HPLCで精製した。純粋な生成物を含む分画を集め、蒸発させて濃縮し、最後に凍結乾燥した。この操作でL-メチオニル-L-メチオニン10.6g(37.8ミリモル、33%)が無定形の粉末として得られた。

固定

塩化物は検出されず、酢酸塩1.9%(w/w)のみが定置され、生成物は大部分両性イオンの形であった。酸加水分解後のアミノ酸分析ではメチオニンが認められ、加水分解しないサンプルには遊離のメチオニンは存在しなかった。

純度

HPLCによる純度：99.8% (ヌクレオシド 7 C₁₈、0.1Mアンモニウムホスフェート、pH3.0/アセトニトリル、220nm)

トリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)との反応およびUV-検出による定数：92.5%

カールフィツシャーによる含水量：1.5%

例18

Tyr (1.01)

Val (0.99)

純度

HPLC-純度：99.5% (Novapak C₁₈、0.1Mアンモニウムホスフェート含有アルキルスルホネート、pH4.5/アセトニトリル、220nm)

UV-定数：97.8% (293nm、0.1M NaOH中チロシン吸収)

例19

D,L-チロシル-アルギニンD,L-tyr Arg OHの製造的合成

L-アルギニン105g(105g、603ミリモル)を水400mlに溶解し、pHをHCl溶液で9.0に調整した。D-チロシルエチルエステル塩酸塩(6.1g、25ミリモル)および0.1M EDTA 5mlを加え、pHを再び9.0に調整した。カルボキシペプチダーゼY溶液(20mg/ml)7mlを加えて反応を開始させ、pHはNaOH溶液の添加によつて9.0に保持した。4時間後にHCl溶液でpHを3に調整して反応を停止させた。

反応混合物を希釈し、Dowex A650W×4カラム上、酢酸アンモニウム塩勾配を用いて陽イオン交換により精製し、最後に蒸発した。生成物の分画を集めて、蒸発させて濃縮し、最後に凍結乾燥すると、D,L-チロシル-アルギニン6.45g(19ミリモル、77%)が白色の粉末として得られた。

L,L-チロシルバリンアミドTyr Val NH₂の製造的合成

操作

L-チロシンエチルエステル塩酸塩(16.0g、65ミリモル)およびL-バリンアミド塩酸塩(60g、390ミリモル)を水1150mlに溶解し、20M EDTA 65mlを加えた。pHを水酸化ナトリウム溶液で9.0に調整し、カルボキシペプチダーゼY溶液(20mg/ml)12mlを加えて反応を開始した。反応液を室温で4時間攪拌し、pHは水酸化ナトリウム溶液を添加して9.0に保持した。交換が完了したのち、pHを11に上昇させて反応を停止させた。

両性酵素を濾去し、反応混合物を希釈し、連続的にDowex A61×4カラム上陰イオン交換およびDowex A650W×4カラム上陽イオン交換を行い、それぞれ酢酸ナトリウムおよびアンモニウム塩勾配を用いて溶出して精製し、最後に蒸発した。生成物の分画を合し、真空下、繰り返し無水エタノールを添加して蒸発乾燥すると、L,L-チロシルバリンアミド11.2g(40ミリモル、62%)が白色粉末として得られた。

固定

1.8%(w/w)の酢酸塩が検出された。生成物は大部分両性イオン型であった。

酸加水分解後のアミノ酸分析では、以下の結果が得られた。

固定

酢酸塩および塩化物は抽出されず、生成物は両性イオンとして存在した。

酸加水分解後のアミノ酸分析では、以下の結果が得られた。

Arg (1.03)

Tyr (0.97)

純度

HPLC-純度: 99.5% (Novapak C₁₈, 0.1 Mアンモニウムホスフェートとアルキルスルホン酸, pH 4.5/アセトニトリル, 220nm)

カールフィツシャーによる水含量: 3.4%

例20

固定化カルボキシペプチダーゼYを用いたD, L-フェニルアラニルメチオニン, D, L-phe-Met-OHの製造的合成

固定化操作

カルボキシペプチダーゼYを、製造者の推奨する操作に従ってEupergit Cに固定化した。固定化はリン酸塩緩衝液中、pH 7.5において行い、残った活性ゲル基はpH 8.0においてエタノールアミンによつて遮断し、ついで洗浄した。

酵素の93%がゲルに結合し、2.5mgタンパク質/μlを含有した。酵素がカップリングしたEupergit Cは10mM PIPES、1mM EDTA、0.05%ヒド

生成物の固定

生成物は塩化物を含まなかつたが、酢酸塩7.0% (w/v) を含有し、一部が酢酸塩型であつた。

アミノ酸分析では、遊離アミノ酸は存在せず、加水分解後には以下の比が得られた。

Met (0.98)

Phe (1.03)

ナトリウムのD値を用い、25℃、水中C=O. 25での旋光度は-128.9°であつた。

生成物の純度

HPLC: 99.6% (ヌクレオシド7 C₁₈, 0.1 Mアンモニウムホスフェート、pH 3/アセトニトリル, 220nm)

カールフィツシャーの水含量: 2.8%

例21

D, D-フェニルアラニルフェニルアラニンエチルエステル塩酸塩, D, D-phepheOEt・HClの製造的合成

操作

D-フェニルアラニンエチルエステル塩酸塩(2.5g, 11ミリモル)を水45mlに溶解し、0.1N EDTA 0.5mlを加えた。pHを水酸化ナトリウムで9.0に調整し、基質は最初一部油状の懸濁液として存在した。カルボキシペプチダーゼY溶液(20mg/ml) 3.4mlを加えて反応を開始し、室温で2.5時間攪拌

ロキシ安息香酸エチルエステル、pH 7.0中、4℃で保存した。

合成操作

O-フェニルアラニンエチルエステル塩酸塩(5.7g, 25ミリモル)およびL-メチオニン(29.8, 200ミリモル)を水400mlに溶解し、0.1N EDTA 5mlを加え、水酸化ナトリウム溶液でpHを9.0に調整し、反応容積を500mlとした。反応混合物を絶えず攪拌し、水酸化ナトリウム溶液でpHを9.0の一定に保持し、この懸濁液は固定化CPD-Yのカラム上に流速3ml/分で循環させた。上述のようにして調整したEupergit C上に固定化CPD-Yを含有するカラムは2.5cm×5.5cm、容積27ml、計67mgのCPD-Yを含有した。前夜を10時間攪拌のち、pHをHCl溶液で7に調整し、生成物は例16に記載したR-製造HPLCによつて精製した。

純粋な生成物を含む分画を合し、真空中で蒸発させ、最後に凍結乾燥すると、D, L-フェニルアラニルメチオニン3.5g(12ミリモル, 48%)が白色無定形粉末として得られた。

酵素プレバレーションの安定性

同じ酵素グルプレバレーションを数回反復使用して実験を行つても、変換率に明らかな低下はなく、相当する結果が得られた。したがつて、酵素は反応条件下においてかなり安定で、さらに過程の経済性が改良された。

し、水酸化ナトリウム溶液を加えてpHを9.0に保持した。HCl溶液でpHを3に調整して反応を停止させた。

反応混合物を透過し、例16に記載したようにR-製造HPLCによつて精製した。

生成物の分画を集めて真空中で蒸発させて濃縮し、HCl溶液を加えて凍結乾燥すると、生成物0.49g(1.3ミリモル, 12%)が白色無定形の粉末として得られた。

固定

生成物は、クロリド9.2%(w/v)を含有し、酢酸塩は存在しなかつた。生成物は塩酸塩として存在した。

アミノ酸分析では酸加水分解後にフェニルアラニンが認められ、酸加水分解前にはフェニルアラニンは見られなかつた。

生成物は塩基でさらに加水分解され、D, L-PhePheOHとはクロマトグラフィーで異なる生成物を与えた。この生成物自体は、使用したHPLC系でL, L-PhePheOEtと混雑し、共溶出した。

最後に、ナトリウムD値を用い、25℃、酢酸中C=O. 5で比旋光度を測定したところ、-42.7°であつた。比較のため純粋なL, L-Phe-PheOEtの標品についても同じ条件で測定したところ、+52.1°の値が得られた。この場合の矛盾は、合成したペプチドの純度が低いことによると考えられる。

純度

HPLC純度: 82.3% (ヌクレオシド7 C₁₈・
0.1Mアンモニウムホスフェート、pH3/アセトニ
リル、220nm)

抽出された不純物は、基質、基質加水分解物、生成物
加水分解物またはそれらのジアステレオマーと一致し
なかった。

カールフィツシャーによる水含量: 7.5%

特表平1-502158(13)

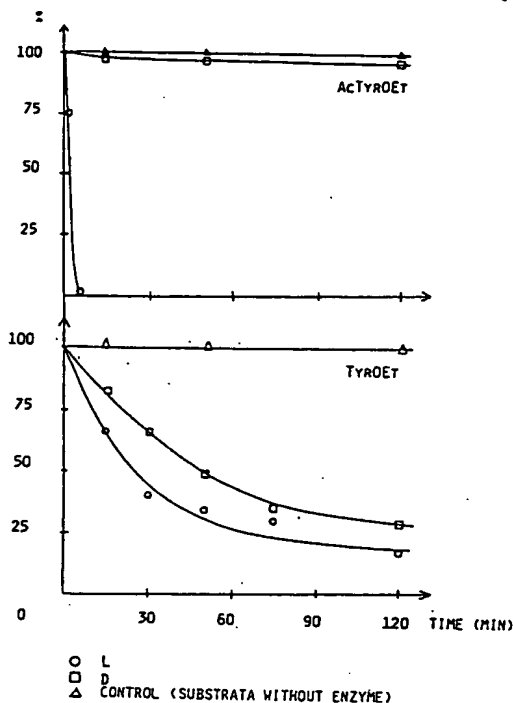


FIGURE 1
Carboxypeptidase Y (10 μ M) Catalyzed Hydrolysis
of L- and D-TyrOEt and of L- and D-AcTyrOEt (50 mM), 20%
DMSO, pH 9.0, 1 mM EDTA

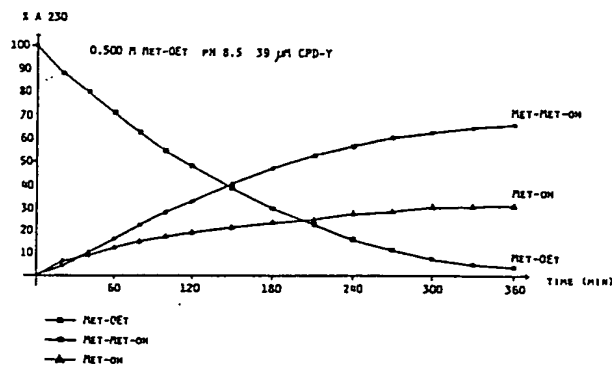
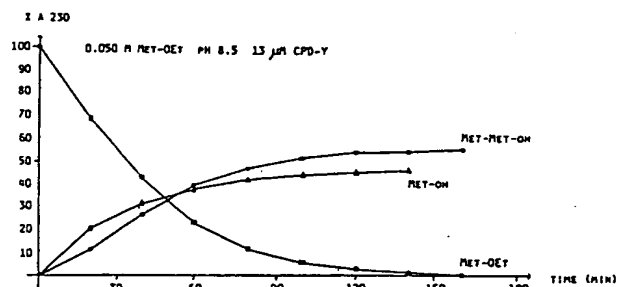


Figure 2
Carboxypeptidase Y catalyzed formation of the homodipeptide
L,L-Methionyl-Methionine from the single starting compound
L-Methionine ethylester at 0.2 M and 0.3 M initial concen-
tration, the nucleophile methionine being generated in situ.
No oligomerisation is observed.
A220 are per cent arbitrary absorbance units at 220 nm with
HPLC-detection.

手続補正書 (自 発)

昭和63年11月8日

特許庁長官殿

1. 事件の表示

昭和63年特許第1111号
PCT/DK88/00022

2. 発明の名称

ジペプチドの酵素的製造方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 カールスバーク バイオテクノロジー
(名 称) リミテッド アクチャーセルスカブ

4. 代 理 人

居 所 〒100 東京都千代田区大手町二丁目2番1号
新 大 手 町 ビ ル ダ ン グ 3 3 1
電 話 (211) 3 6 5 1 (代 表)
氏 名 (6669) 浅 村 皓

5. 補正命令の日付

昭和 年 月 日

6. 補正により増加する発明の数

7. 補正の対象

明細書及び請求の範囲翻訳文

8. 補正の内容

別紙のとおり
明細書及び請求の範囲翻訳文の浄書
(内容に変更なし)

方 式 ①

手続補正書 (自 発)

昭和 63 年 10 月 8 日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

PCT/OK88/00022

2. 発明の名称

ジベアチドの酵素的製造方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 カールスパーグ バイオテクノロジー
氏名 リミテッド アクチーセルスカブ

4. 代理人

住所 〒100 東京都千代田区大手町二丁目2番1号
新大手町ビルディング 331
電話 (211) 3651 (代表)
氏名 (6669) 浅 村 皓

5. 補正命令の日付

昭和 年 月 日

6. 補正により増加する発明の数

7. 補正の対象

補正書の翻訳文

8. 補正の内容

別紙のとおり
補正書の翻訳文の浄書
(内容に変更なし)

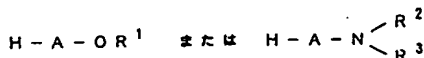
浄書(内容に変更なし)
補正された請求の範囲

〔国際事務局により1988年7月18日(18.07.88)受領された。原請求の範囲第1項および第10項が補正された。他は変更なし(5頁)〕

(1) (補正)一般式



(式中、Aは側鎖が保護されていてもよいL-もしくはD-α-アミノ酸残基またはω-アミノ酸残基であり、Bは側鎖が保護されていてもよいAと同種もしくは異種のL-もしくはD-α-アミノカルボン酸残基、L-もしくはD-β-アミノカルボン酸残基またはL-もしくはD-アミノスルホン酸残基、または相当するω-アミノ酸、またはその塩および水和物であり、YはOHまたはC末端保護基である)を有するジベアチドを製造する方法において、式



(式中、Aは先に定義したとおりであり、R¹は水素、アルキル、アリールもしくはアラールキルであつて不活性置換基によつて置換されていてもよく、またアミノ酸のα-デス-アミノフラグメントであり、R²およびR³は同種または異種であつて、それぞれ水素、アルキル、アリールまたはアラールキルであつて不活性置換基

特表平1-502158(14)

補正書の翻訳文提出書 (特許法第184条の7第1項)

昭和 63 年 10 月 12 日

特許庁長官 殿

1. 特許出願の表示 PCT/OK88/00022

2. 発明の名称

ジベアチドの酵素的製造方法

3. 特許出願人

住所(居所) デンマーク国 デイケー - 2200 コペンハーゲン エヌ、
タゲンスベス 16

氏名(名称) カールスパーグ バイオテクノロジー リミテッド アクチーセルスカブ

4. 代理人

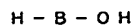
住所 〒100 東京都千代田区大手町二丁目2番1号
新大手町ビルディング 331
電話 (211) 3651 (代表)
氏名 (6669) 浅 村 皓

5. 補正書の提出年月日 1988 年 7 月 18 日

6. 添付書類の目録 補正書の翻訳文 1通

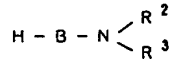
で置換されていてもよい)を有するアミノ酸誘導体である基質成分を、A=Bの場合は in situで形成されてもよい、

(a) 式



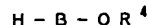
(式中、Bは先に定義したとおりのアミノカルボン酸である)を有するアミノ酸、

(b) 式



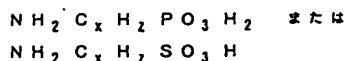
(式中、Bは先に定義したとおりのアミノカルボン酸であり、R²およびR³は上述の意味を有するが、R²が水素の場合にはR³はヒドロキシまたはアミノである)を有するアミノ酸アミド、

(c) 式



(式中、Bは先に定義したとおりのアミノカルボン酸であり、R⁴はアルキル、アリールまたはアラールキルである)を有するアミノ酸エステル、および

(d) 式



(式中、xは1~6であり、zは2~12である)を有する直鎖状または分枝状アミノスルホン酸またはアミノスルホン酸

から選ばれる求核成分とを、酵母、動物、植物または他の微生物類からのセリンまたはチオールカルボキシペプチダーゼの存在下、pH5～10.5、所望により有機溶媒および/または塩を含有する水性溶液または懸濁液中で反応させ、ついで所望により、存在する側鎖保護基もしくは保護基Yの切断および/または、所望により、得られたジペプチド誘導体の塩または水和物への変換を行うことを特徴とする製造方法。

(2) カルボキシペプチダーゼとして、酵母からのカルボキシペプチダーゼYを使用する請求の範囲第1項による製造方法。

(3) 使用されるカルボキシペプチダーゼは、重合側鎖骨格と複数のカプリングされたベンジルスクシニル基からなるアフィニティ側面上アフィニティクロマトグラフィーによつて精製されている請求の範囲第2項による製造方法。

(4) 使用されるカルボキシペプチダーゼは、*Penicillium janthinellus*からのペニシロカルボキシペプチダーゼS-1もしくはS-2、*Aspergillus saitoi*もしくは*Aspergillus oryzae*からのカルボキシペプチダーゼ、オレンジの葉もしくは皮からのカルボキシペプチダーゼC、*Citrus natsudaoidai* Hayata からのカルボキシペプチダーゼC_{II}、豆の葉からのファセオリン、または発芽大麦、モルト、ワタの胚芽、トマト、スイカもしくはアロメリン(パイナップル)皮からのカルボキシペ

プチダーゼである請求の範囲第1項による製造方法。

(5) 使用されるカルボキシペプチダーゼは、天然型の化学修飾された酵素または合成成体である請求の範囲第1項から第4項までによる製造方法。

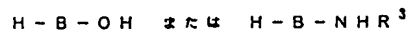
(6) 使用されるカルボキシペプチダーゼは、固定化されている前記請求の範囲のいずれかによる製造方法。

(7) 有機溶媒0～70%を含有する水性反応溶液または反応分散液を使用する前記請求の範囲のいずれかによる製造方法。

(8) 有機溶媒はアルコール類、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド、ジメトキシエタン、エチレングリコールまたは酢酸エチルから選ばれる請求の範囲第7項による製造方法。

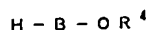
(9) 基質成分として、不活性置換基で置換されていてもよいベンジルエステルまたは酸塩基もしくは分枝状のC₁～C₆アルキルエステルから選ばれるD-またはL-アミノ酸エステルを使用する前記請求の範囲のいずれかによる製造方法。

(10) (補正) 求核成分として、式



(式中、R³は水素またはC₁～C₃アルキルであり、BはL-アミノ酸残基である)を有するアミノ酸またはアミノ酸アミドを使用する前記請求の範囲のいずれかによる製造方法。

(11) 求核成分として、式



(式中、Bはアミノカルボン酸残基であり、R⁴はC₁～C₃アルキルである)を有するエステルを使用する請求の範囲第1項による製造方法。

(12) 得られたジペプチドが1個または2個以上のC末端保護基Yを包含し、この1個または2個以上の基を酵素的に、好ましくは前の反応で使したと同じカルボキシペプチダーゼ酵素により切断する前記請求の範囲のいずれかによる製造方法。

(13) 得られたジペプチドが1個または2個以上の側鎖保護基を包含し、この1個または2個以上の基を酵素的に、好ましくはエステラーゼもしくはリパーゼまたはタンパク分解酵素によつて切断する前記請求の範囲のいずれかによる製造方法。

国際調査報告

International Application No. PCT/DK88/00022

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (Inventor's classification symbol, if any, in parentheses) According to International Patent Classification (IPC) or to both International Classification and IPC A		
C 12 P 21/02, C 07 K 1/00		
2. FIELD SEARCHED		
Classification System		
IPC 4	C 12 P 21/02; C 07 K 1/00 - /14	
IPC 3	C 07 C 103/52; C 12 D 13/04	.../...
3. DOCUMENTS SEARCHED (Inventor's classification symbol, if any, in parentheses) to the extent that such documents are included in the Patent Abstracts		
SE, NO, DK, FI classes as above		
4. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Relevant to Claim 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100	Relevant to Claim 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100
Y	EP, A1, 0 074 053 (TOYO SODA MANUFACTURING CO LTD) 16 March 1983 See page 17, lines 13-33	1-13
Y	EP, A1, 0 086 053 (UNIFIKA LTD) 17 August 1983 See the claims	1-12
Y	EP, A1, 0 099 583 (TOYO SODA MANUFACTURING CO LTD) 1 February 1984 See the claims	1-12
Y	EP, A1, 0 017 483 (DC FORENEDE BRYGGERIER A/S) 13 October 1980 See page 3, lines 1-3, page 6-7 and the claims	1-12
A	US, A, 3 972 773 (SAGAMI CHEMICAL RESEARCH CENTER) 3 August 1976 .../...	1-12
5. REFERENCES CITED		
Date of filing of the International Patent Application		
1988-08-15		
Date of filing of the International Patent Application		
1988-05-17		
Swedish Patent Office		
Björn Sjöström Wonne Sjöström		

Form PCT/ISA/210 (revised March 1989)

International Application No. PCT/DK88/00022

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET	
11	<p><u>Fields searched (cont)</u></p> <p>US C1 <u>435:68-70; 192:4, 29, 30</u></p>
<p><input checked="" type="checkbox"/> OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNREACHABLE</p> <p>The international search report has not been completed in respect of certain claims under Article 17(2) for the following reasons:</p> <p><input type="checkbox"/> Claim numbers _____ because they relate to subject matter not required to be searched by the Authority, namely:</p> <p><input type="checkbox"/> Claim numbers _____ because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements in such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:</p> <p><input type="checkbox"/> Claim numbers _____ because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of PCT Rule 1.4(a).</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING</p> <p>The International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:</p> <p><input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchably distinct inventions of the international application.</p> <p><input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:</p> <p><input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is concerned by claim number(s):</p> <p><input type="checkbox"/> As all searchably distinct claims could be examined without effort justifying an additional fee, the international Searching Authority did not make payment of any additional fee.</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by applicant's protest.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

Form PCT/ISA/210 (supplemental sheet) (2) (January 1988)

International Application No. PCT/DK88/00022

B. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category	Character of Document, with reference, where appropriate, to the relevant paragraph	Reference to Claim No.
A	<p>US. A. 4 086 136 (ISOMA ET AL.) 25 April 1978</p>	1-12

Form PCT/ISA/210 (sheet 2) (January 1988)

第1頁の続き

②発明者 アースムルーオルセン, ステイ
ツグ

デンマーク国 デイーケー-2942 スコドスボルグ, エステー.
ティーブイ. スコドスボルグベユ 410